

528,060

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES  
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
22. April 2004 (22.04.2004)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
WO 2004/033615 A1

(51) Internationale Patentklassifikation<sup>7</sup>: C12M 3/00

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2002/010357

(22) Internationales Anmeldedatum:  
16. September 2002 (16.09.2002)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von  
US): PAN-BIOTECH GMBH [DE/DE]; Gewerbepark 13,  
94501 Aidenbach (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): SEIDL, Josef  
[DE/DE]; Matthias-Götz-Strasse 8, 94501 Aldersbach  
(DE). SCHERZE, Wilhelm [DE/DE]; Spargelweg 11,  
90765 Fürth (DE).

(81) Bestimmungsstaat (national): US.

(84) Bestimmungsstaaten (regional): europäisches Patent (AT,  
BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR,  
IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR).

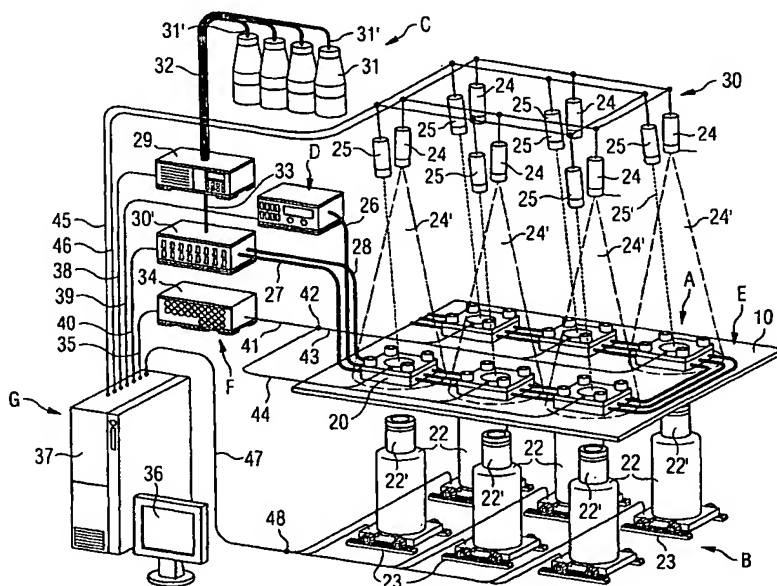
Veröffentlicht:

— mit internationalem Recherchenbericht

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: METHOD FOR CULTIVATING CELLS, PARTICULARLY HUMAN OR ANIMAL CELLS

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR KULTIVIERUNG VON ZELLEN, INSBESONDERE MENSCHLICHER ODER TIERI-  
SCHER ZELLEN



(57) Abstract: The invention relates to a method for cultivating cells of the most diverse type, particularly human or animal cells. According to the invention, a culture is prepared from cells of at least one specified type in a defined environment, and the cells of the relevant culture are supplied with assigned, liquid nutrient media, growth factors, gases and the like. A combination of the following method steps is provided: a) preparing at least one cell culture inside at least one cell culture chamber (20) of a cell culture system (30); b) starting a flow of freely selectable, defined liquid media into the at least one cell culture chamber (20) in order to continuously supply the at least one cell culture; c) starting a flow of different gases with freely selectable concentrations into the at least one cell culture chamber (20) in order to effect a constant and continuous gassing of the at least one cell culture; d) effecting a regulated or controlled heating of

the at least one cell culture chamber (20) in such a manner as to ensure a constant temperature therein over the duration of an experiment; e) carrying out permanent microscopic observation of the at least one cell culture inside the at least one cell culture chamber (20) without removing samples of the cell culture over the duration of an experiment, and; f) permanently measuring all relevant cell culture parameters using corresponding sensors that are integrated inside the at least one cell culture chamber (20).

(57) Zusammenfassung: Bei einem Verfahren zur Kultivierung von Zellen verschiedenster Art, insbesondere menschlicher oder tierischer Zellen, wobei von Zellen wenigstens einer bestimmten Art jeweils eine Kultur in einer definierten Umgebung angesetzt wird und wobei die Zellen der betreffenden

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

WO 2004/033615 A1



*Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.*

---

Kultur mit zugeordneten, flüssigen Nährmedien, Wachstumsfaktoren, Gasen und dergleichen versorgt werden, ist die Kombination folgender Verfahrensschritte vorgesehen: a) Ansetzen wenigstens einer Zellkultur innerhalb wenigstens einer Zellkulturkammer (20) eines Zellkultursystems (30); b) Ingangsetzen eines Flusses frei wählbarer, definierter, flüssiger Medien in die wenigstens eine Zellkulturkammer (20) zur kontinuierlichen Versorgung der wenigstens einen Zellkultur; c) Ingangsetzen eines Stromes unterschiedlicher Gase mit frei wählbaren Konzentrationen in die wenigstens eine Zellkulturkammer (20) zur konstanten, kontinuierlichen Begasung der wenigstens einen Zellkultur; d) geregeltes bzw. gesteuertes Beheizen der wenigstens einen Zellkulturkammer (20) in der Art und Weise, dass hierin eine konstante Temperatur während der Dauer eines Versuches gewährleistet wird; e) permanentes mikroskopisches Beobachten der wenigstens einen Zellkultur innerhalb der wenigstens einen Zellkulturkammer (20), ohne während der Dauer eines Versuches Proben der Zellkultur zu entnehmen; und f) permanentes Messen sämtlicher relevanten Zellkulturparameter mittels entsprechender, in die wenigstens eine Zellkulturkammer (20) integrierter Sensoren.

PAN-Biotech, GmbH, Gewerbepark 13, D-94501 Aidenbach

Verfahren zur Kultivierung von Zellen, insbesondere  
menschlicher oder tierischer Zellen

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Kultivierung von Zellen verschiedenster Art, insbesondere menschlicher oder tierischer Zellen, wobei von Zellen wenigstens einer bestimmten Art jeweils eine Kultur in einer definierten Umgebung angesetzt wird und wobei die Zellen der betreffenden Kultur mit zugeordneten, flüssigen Nährmedien, Wachstumsfaktoren, Gasen oder dergleichen versorgt werden.

Kulturen der vorgenannten Art werden im allgemeinen von einzelnen Zellen angesetzt, die entweder von Gewebeteilen, von primären Kulturen, von Zell-Linien oder Zell-Stämmen durch enzymatische, mechanische oder chemische Zerteilung herrühren.

Bei bisher bekannten Zellkultivierungsverfahren werden zum Ansetzen der Kulturen in der Regel aus Kunststoff bestehende Kulturgefäße verwendet, die in CO<sub>2</sub>-Brutschränken inkubiert werden. Diese garantieren eine konstante Temperatur (z.B. 37°C) und eine Pufferung des Mediums durch eine 5 %- bis 10 %-ige CO<sub>2</sub>-Begasung. Die Sauerstoffversorgung erfolgt durch einfache Diffusion. Bei den bekannten Verfahren und Einrichtungen zur Kultivierung von Zellen sind Co-Kultivierung und frei veränderliche Inkubationsbedingungen in der Regel nicht möglich.

Zur mikroskopischen Beobachtung oder zu speziellen Untersuchungen müssen die Kulturgefäße aus dem jeweiligen Brutschank entnommen werden, wobei die Inkubation unterbrochen wird, die Zellen sich abkühlen und somit die Versuchsbedingungen nicht mehr konstant sind.

Die bisher bekannten Verfahren zur Kultivierung von Zellen werden jedoch den Anforderungen der modernen Zellkulturtechnologie nicht mehr gerecht.

Insbesondere im Hinblick auf aktuelle Forschungsschwerpunkte in der Pharmaindustrie, die in den Bereichen Entzündung (Rheuma), Krebsbekämpfung, Herz/Kreislauf-Erkrankungen, Aids, Apoptose (programmierter Zelltod) und Blutgerinnung liegen, ist die Entwicklung und Erprobung entsprechender neuer Wirkstoffe und Medikamente mit Hilfe eines neuen Verfahrens zur Kultivierung von Zellen unabdingbar, das es ermöglicht, die Substanz- und Wirkungstestung unter nahezu in-vivo-Bedingungen, d.h., mit nahezu perfekter Abbildung komplexer biologischer Systeme, vor Übertritt in die klinischen Phasen (Testung an Probanden) durchzuführen.

Mit Rücksicht auf die wie oben geschilderte Situation besteht die Forderung nach einer Möglichkeit der Simulation von Reaktionsabläufen innerhalb eines oder mehrerer Organsysteme (z.B. durch Serienschaltung von Zellkulturkammern mit Hepatozyten und anderen Zellarten, Untersuchung auf Abbauprodukte und Metabolite), damit zum einen die Zeiträume zwischen Substanzwirkungserkennung und Arzneimittelzulassung erheblich minimiert werden und zum anderen vor dem Eintritt in die klinische Testphase die notwendigen Erkenntnisse über den Wirkungsmechanismus der Substanz innerhalb eines komplexen biologischen Systems erlangt werden können.

Eine ähnliche Situation liegt beispielsweise auch im Bereich der Kosmetikindustrie vor.

Im Stand der Technik sind beispielsweise multivalente Zellkultursysteme (vgl. z.B. DE 199 15 178 A1), problemadaptierte Zellkultursysteme für spezifische Aufgabenstellungen (vgl. z.B.

WO 98/17822) oder Verfahren zur Replikation von Zellkulturen bekannt (vgl. z.B. WO 97/37001).

Ferner ist beispielsweise aus der WO 99/23206 ein Verfahren zum Mischen einer varizella-infizierten Zellkultur in Rollflaschen bekannt.

Schließlich sind aus der EP 0 999 266 A1 ein Verfahren und eine Vorrichtung zur Aufnahme einer Zellkultur bekannt, wodurch möglichst homogene Bedingungen für die molekularbiologische oder gentechnische Untersuchung von Zellen geschaffen werden sollen.

Mit Rücksicht auf die eingangs geschilderte Situation auf dem Gebiet der modernen Zellkulturtechnologie liegt der vorliegenden Erfindung nunmehr die Aufgabe zugrunde, ein neues, verbessertes Verfahren zur Kultivierung von Zellen verschiedenster Art, insbesondere menschlicher oder tierischer Zellen zu schaffen, das die Nachteile der bisher bekannten Verfahren beseitigt und insbesondere die Möglichkeit bietet, hochkomplexe, biologische Vorgänge in Echtzeit und unter nahezu in-vivo-Bedingungen (d.h. wie im lebenden Organismus) zu simulieren, wobei letztendlich ein computergesteuerter Verfahrensablauf realisierbar sein soll.

Ausgehend von einem Verfahren zur Kultivierung von Zellen verschiedenster Art, insbesondere menschlicher oder tierischer Zellen, wobei von Zellen wenigstens einer bestimmten Art jeweils eine Kultur in einer definierten Umgebung angesetzt wird und die Zellen der betreffenden Kultur mit zugeordneten, flüssigen Nährmedien, Wachstumsfaktoren, Gasen und dergleichen versorgt werden, wird die wie vorstehend definierte Aufgabe erfindungsgemäß durch die Kombination folgender Verfahrensschritte gelöst:

- a) Ansetzen wenigstens einer Zellkultur innerhalb wenigstens einer Zellkulturkammer eines Zellkultursystems;
- b) Ingangsetzen eines Flusses frei wählbarer, definierter, flüssiger Medien in die wenigstens eine Zellkulturkammer zur kontinuierlichen Versorgung der wenigstens einen Zellkultur;
- c) Ingangsetzen eines Stromes unterschiedlicher Gase mit frei wählbaren Konzentrationen in die wenigstens eine Zellkulturkammer zur konstanten, kontinuierlichen Begasung der wenigstens einen Zellkultur;
- d) geregeltes bzw. gesteuertes Beheizen der wenigstens einen Zellkulturkammer in der Art und Weise, daß hierin eine konstante Temperatur während der Dauer eines Versuches gewährleistet wird;
- e) permanentes mikroskopisches Beobachten der wenigstens einen Zellkultur innerhalb der wenigstens einen Zellkulturkammer, ohne während der Dauer eines Versuches Proben der Zellkultur zu entnehmen; und
- f) permanentes Messen sämtlicher relevanten Zellkulturparameter mittels entsprechender, in die wenigstens eine Zellkulturkammer integrierter Sensoren.

Bei dem erfindungsgemäßen Verfahren wird in bevorzugter Weise innerhalb einer vorgegebenen Anzahl von Zellkulturkammern die entsprechende Anzahl von Zellkulturen gleichzeitig angesiedelt und es werden sodann die weiteren Verfahrensmaßnahmen, wie oben definiert, durchgeführt.

Hierbei können die Zellkulturkammern entweder in Reihe oder parallel geschaltet werden.

Durch das erfindungsgemäße Verfahren zur Kultivierung von Zellen ist insbesondere gewährleistet, daß die Zellen sämtlicher Kulturen mit flüssigen Nährmedien, Wachstumsfaktoren, Gasen oder dergleichen kontinuierlich versorgt werden, ohne daß die Zellen einer Kultur ihrer gewohnten, definierten Umgebung entnommen werden müssen, während gleichzeitig sämtliche Zellkulturen ohne Unterbrechung der Begasung permanent mikroskopisch beobachtet werden können.

Gemäß weiterer Ausgestaltung des erfindungsgemäßen Verfahrens können während der Dauer eines Versuchs die Art der flüssigen Medien und/oder deren Strömungsrichtungen und/oder deren Verteilung und/oder deren Durchflußmengen variiert werden, es können aber auch die Art der Gase und/oder deren Strömungsrichtungen und/oder deren Verteilung und/oder die Begasungskonzentrationen variiert werden, was letztendlich dazu führt, daß das erfindungsgemäße Verfahren außerordentlich flexibel gestaltet werden kann.

Insbesondere können im Falle von in Reihe geschalteten Zellkulturkammern eines Zellkultursystems die flüssigen Medien von Zellkulturkammer zu Zellkulturkammer kontinuierlich weitergeleitet werden.

In entsprechender Weise können auch die Gase von Zellkulturkammer zu Zellkulturkammer kontinuierlich weitergeleitet werden.

Um bei dem erfindungsgemäßen Verfahren zur Zellkultivierung während der Dauer eines Versuches in den einzelnen Zellkulturkammern konstante Temperaturen zu gewährleisten, werden die in den einzelnen Zellkulturen herrschenden Temperaturen permanent gemessen und als Temperatur-Istwerte einem entsprechenden Temperaturregel- bzw. Temperatursteuerkreis eingegeben, so daß die Beheizung der jeweiligen Zellkulturkammer entsprechend geregelt bzw. gesteuert werden kann.

Wie weiter unten im einzelnen noch näher erläutert wird, weist zu diesem Zweck jede einzelne Zellkulturkammer eine eigene Heizung auf, während oberhalb der betreffenden Zellkulturkammer jeweils ein Infrarot-Temperaturmesser angeordnet ist, der die in der betreffenden Zellkultur herrschende Temperatur mißt und diesen Temperaturmeßwert an ein Überwachungs- und Steuerungssystem meldet. Ändert sich die anfangs vorgegebene Temperatur in der wenigstens einen Zellkulturkammer, dann wird durch den Temperaturregel- bzw. Steuerkreis bewirkt, daß die Heizleistung der jeweiligen Zellkulturkammerbeheizung vermindert bzw. erhöht wird. Die Temperaturmessung kann aber auch mit Hilfe anderer Temperatursensoren erfolgen.

Wie ebenfalls weiter unten noch näher erläutert wird, sind aus Flexibilitätsgründen die Temperaturen in den einzelnen Zellkulturkammern durch das Überwachungs- und Steuerungssystem während der gesamten Versuchsdauer frei einstellbar und veränderbar.

Eine weitere, besonders vorteilhafte Verfahrensausgestaltung besteht darin, daß innerhalb wenigstens einer Zellkulturkammer zu beiden Seiten einer dort installierten gasdurchlässigen Membran je eine Zellkultur unterschiedlicher Art zum Zwecke einer direkten Co-Kultivierung beider Zellkulturen angesetzt wird.

Eine derartige Co-Kultivierung erfolgt in bevorzugter Weise dadurch, daß die auf der einen Seite der Membran, d.h. auf der apikalen Seite wachsenden Zellen der ersten Zellkultur durch einen ersten Medienfluß versorgt werden, wohingegen die auf der anderen Seite der Membran, d.h. der basolateralen Seite wachsenden Zellen der zweiten Zellkultur mit einem gegenüber dem ersten Medienfluß unterschiedlichen, zweiten Medienfluß versorgt werden. Somit funktionieren die Zellen auf der apikalen Seite als Deckschicht, während die Zellen auf der basolateralen Seite als Innenzellen funktionieren. Die Zellen der ersten Zellkultur und die Zellen der zweiten Zellkultur weisen hierbei



durch die Membran einen recht engen Kontakt zueinander auf, so daß die Möglichkeit besteht, Austauschvorgänge innerhalb der Schichten auf der apikalen Seite und der basolateralen Seite zu untersuchen.

Darüberhinaus besteht noch die Möglichkeit, daß dann, wenn gasdurchlässige Membranen mit unterschiedlichen, wählbaren Porengrößen verwendet werden, ein möglicher Austausch von wirksamen bioaktiven Molekülen (z.B. Wachstumsfaktoren, Hormonen, usw.) im Zuge einer derartigen Co-Kultivierung untersucht werden kann. Solche Untersuchungsmöglichkeiten sind insbesondere bei Gewebeteilen wichtig, die aus verschiedenen Zellarten aufgebaut sind, beispielsweise Übergang Endothelzellen-Fibroblasten (Adern) oder Schleimhautzellen-Fibroblasten (Darm, Magen).

Ferner besteht eine weitere, besonders vorteilhafte Verfahrensausgestaltung in der Anwendung des erfindungsgemäßen Verfahrens zur indirekten Co-Kultivierung, wobei verschiedene biologische Systeme (d.h. Gewebe-/Zellarten) in entsprechenden Zellkulturkammern hintereinander geschaltet werden. Auf diese Weise lassen sich ganze Organsysteme gleichsam nachbauen und die entsprechenden Stoffwechselvorgänge untersuchen. Diese Maßnahmen lassen sich durch ein Beispiel näher erläutern: Ein an sich ungiftiger Stoff wird über den Verdauungstrakt aufgenommen und gelangt über den Blutstrom in die Leber. Die Leberzellen bauen den Stoff in Abbauprodukte um, die unter Umständen toxisch wirken können. Um dies zu überprüfen, wird die "verdächtige" Substanz in eine Inkubationskammer eingegeben, die mit Hepatozyten (Leberzellen) besiedelt ist. Über eine definierte Nährmedierversorgung (Medienfluß = "Ader") gelangen evtl. toxische Abbauprodukte in eine sich anschließende Zellkulturkammer, so daß dort z.B. aus absterbenden Nervenzellen auf eine neurotoxische Substanz geschlossen werden kann.

Gemäß einer weiteren, außerordentlich vorteilhaften Ausgestaltung des erfindungsgemäßen Verfahrens ist ein videounterstütztes mikroskopisches Beobachten der wenigstens einen Zellkultur in der wenigstens einen Zellkulturkammer vorgesehen, wie dies ebenfalls weiter unten noch näher erläutert wird.

Das erfindungsgemäße Verfahren läßt sich auch noch dahingehend weiter ausgestalten, daß sämtliche Daten, die gewonnen werden durch

- permanentes mikroskopisches Beobachten der wenigstens einen Zellkultur innerhalb der wenigstens einen Zellkulturkammer und/oder
- permanentes Messen der relevanten Zellkulturparameter und/oder
- permanentes Messen der in der wenigstens einen Zellkultur innerhalb der wenigstens einen Zellkulturkammer herrschenden Temperatur,

zu einem computergesteuerten Überwachungs- und Steuerungssystem zur dortigen Weiterverarbeitung übertragen werden.

Hierbei erfolgt insbesondere das permanente Messen der relevanten Zellkulturparameter mit Hilfe eines software-unterstützten Meßverfahrens.

Eine kontinuierliche Messung von Zellkulturparametern läßt sich vorzugsweise durch spezielle Sonden bzw. Sensoren, beispielsweise für pH-Wert, Lactat, Elektropotential und dergleichen mehr, durchführen, wobei diese Messungen durch eine entsprechende Software ausgewertet und dargestellt werden können. Diese Art der Messung liefert gegenüber herkömmlichen Methoden exaktere Ergebnisse, wodurch bestimmte Fragestellungen analysiert

werden können, die mit bisher verwendeten Meßverfahren nicht durchführbar sind. Mit Hilfe eines solchen software-unterstützten Meßverfahrens lassen sich beispielsweise bestimmte Tierversuche in der präklinischen Phase größtenteils ersetzen.

Die Erfindung wird nunmehr nachfolgend anhand von Ausführungsbeispielen näher erläutert, wobei zeigen:

Figur 1 eine schematische Ansicht eines zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens zur Kultivierung von Zellen dienenden, kompletten, geschlossenen Zellkultursystems, bei dem eine vorgegebene Anzahl von Zellkulturkammern zum Einsatz gelangt; und

Figur 2 eine schematische Darstellung einer Hintereinanderschaltung von Zellkulturkammern des in Figur 1 dargestellten Zellkultursystems.

Figur 1 zeigt ein geschlossenes Zellkultursystem 30, bei dem beispielsweise sechs Zellkulturkammern 20 als Gruppe A auf einer entsprechend zugeordneten Basis 21 plaziert sind. Insbesondere bildet die Basis 21 ein Heizsystem E für die Inkubierung, das während der Betriebszeit des Zellkultursystems 30 konstante Temperaturen innerhalb jeder der Zellkulturkammern 20 der Zellkulturkammergruppierung A gewährleistet.

Vorzugsweise erfolgt mit Hilfe dieses Heizsystems E eine elektrische Beheizung der jeweiligen Zellkulturkammer 20, wodurch eine sehr genaue Temperaturregelung ermöglicht ist. Dieses Heizsystem E ist insbesondere in der Weise ausgelegt, daß jede einzelne Zellkulturkammer 20 der Zellkulturkammergruppierung A über ihre eigene Heizung verfügt, die in der Basis 21 integriert ist.

Mit besonderem Vorteil ist das Heizsystem E über eine zugeordnete Software steuerbar. Zu diesem Zweck ist oberhalb der Zellkulturkammergruppierung A ein System aus Infrarot-Temperaturmessern 25 installiert, in der Art, daß jeder einzelnen Zellkulturkammer 20 ein entsprechender Infrarot-Temperaturmesser 25 zugeordnet ist. Der jeweilige Infrarot-Temperaturmesser 25 fühlt mit Hilfe eines von der jeweiligen Zellkulturkammer 20 ausgehenden Infrarotstrahls 25' die in der Zellkultur vorherrschende Temperatur ab und meldet das entsprechende Meßergebnis permanent an ein computergesteuertes Überwachungs- und Steuerungssystem G, das im wesentlichen aus einer Datenverarbeitungsanlage 37 und einem zugehörigen Monitor 36 besteht. Die einzelnen Infrarot-Temperaturmesser 25 sind über eine gemeinsame Verbindungsleitung 45 an das Überwachungs- und Steuerungssystem G angeschlossen. Wenn sich die anfangs vorgegebenen Temperaturen in den Zellkulturkammern 20 der Zellkulturkammergruppierung A ändern, erfolgt automatisch über das Überwachungs- und Steuerungssystem G eine Steuerung bzw. Regelung des Heizsystems E, d.h., die in der einzelnen Zellkulturkammer 20 herrschende Temperatur wird permanent auf eine konstante Temperatur eingeregelt.

Anstatt mittels Infrarot-Temperaturmessern 25 könnte die Temperaturmessung in der einzelnen Zellkulturkammer 20 aber auch mit Hilfe anderer Temperatursensoren durchgeführt werden.

Darüberhinaus kann mit Hilfe der in dem Überwachungs- und Steuerungssystem G enthaltenen Software ermöglicht werden, daß die Temperaturen in den einzelnen Zellkulturkammern 20 der Zellkulturkammergruppierung A während der gesamten Versuchsdauer frei einstellbar und wählbar sind, falls dies aus bestimmten Gründen erforderlich sein sollte.

Zum Zwecke einer permanenten, videogestützten mikroskopischen Beobachtung des Inneren der jeweiligen Zellkulturkammer 20 ist

ein Videosystem B mit einem entsprechend zugeordneten Mikroskopsystem vorgesehen. Dieses Videosystem B wird im folgenden näher erläutert.

Unterhalb jeder einzelnen Zellkulturkammer 20 der Zellkulturkammergruppierung A, die im vorliegenden Ausführungsbeispiel insgesamt sechs Zellkulturkammern aufweist, ist eine Videokamera 22 mit Mikroskopaufsatz 22' auf einem mechanisch einstellbaren Fahrtisch 23 angeordnet, somit insgesamt sechs Videokameras 22 mit zugehörigem Mikroskopaufsatz 22'. Somit beobachtet je eine Videokamera 22 mit Mikroskopaufsatz 22' je eine Zellkulturkammer 20. Nach Versuchsstart und nachdem sich aussagekräftige Bereiche in der jeweiligen in der Zellkulturkammer 20 enthaltenen Zellkultur abzeichnen, wird ein Beobachtungssektor in der Zellkulturkammer 20 festgelegt. Dieser Beobachtungssektor wird sodann durch den mechanisch einstellbaren Fahrtisch 23 mittels (nicht dargestellter) Einstellschrauben angefahren, so- dann wird der Fahrtisch 23 arretiert und das Videosystem B bleibt infolgedessen während der gesamten Versuchsdauer in der gleichen Position. Ferner wird bei Versuchsstart die Schärfe der Einstellung am jeweiligen Mikroskopaufsatz 22' einjustiert. Dieser Justiervorgang am jeweiligen Mikroskopaufsatz 22' erfolgt für sämtliche sechs Zellkulturkammern 20 und bleibt so- dann unverändert bis zum Versuchsende.

Vorzugsweise wird auch das Videosystem B über die im Überwachungs- und Steuerungssystem G enthaltene Software gesteuert. Hierbei wird jede einzelne Videokamera 22 mit Mikroskopaufsatz 22' gesteuert. Dies erfolgt insbesondere in der Art, daß in frei wählbaren Zeitintervallen (beispielsweise im Minutentakt) Bilder von der jeweiligen Zellkultur in der Zellkulturkammer 20 aufgenommen werden, wobei zu dem jeweiligen Zeitpunkt einer solchen Aufnahme eine oberhalb der jeweiligen Zellkulturkammer 20 angeordnete Lichtquelle 24 die entsprechende Zellkultur beleuchtet, so daß eine ausreichende Ausleuchtung des Inneren der

Zellkulturkammer 20 für die Videoaufnahmen gewährleistet ist. Wenn die Videoaufnahme beendet ist, bringt die Steuerung die jeweilige Lichtquelle 24 in einen schwach dimmenden Standby-Zustand, bis die nächste Videoaufnahme gemacht wird. Der von einer jeden Lichtquelle 24 ausgehende Lichtstrahl bzw. Lichtkegel, der in das Innere einer jeweiligen Zellkulturkammer 20 durch eine entsprechende (nicht dargestellte) Glasscheibe eintritt, ist in Figur 1 mit 24' bezeichnet.

Sämtliche Lichtquellen 24 sind über eine gemeinsame Verbindungsleitung 46 an das Überwachungs- und Steuerungssystem G angeschlossen.

Durch jeden einzelnen Lichtstrahl bzw. Lichtkegel 24 wird die jeweilige, in der Zellkulturkammer 20 enthaltene Zellkultur flächendeckend ausgeleuchtet.

Das Videosystem B ist ebenfalls über eine Leitung 47 an das Überwachungs- und Steuerungssystem G angeschlossen, wobei von diesem aus die Leitung 47 zu einem Knotenpunkt 48 führt, mit dem die einzelnen Videokameras 22 über entsprechend zugeordnete Leitungen verbunden sind.

Das wie oben erläuterte Videosystem B mit Mikroskopsystem stellt nur eine Ausführungsmöglichkeit dar. Eine mögliche andere Ausführungsform eines solchen Systems zur permanenten Beobachtung des Inneren der Zellkulturkammern besteht darin, daß ein einziges Beobachtungssystem, bestehend aus Videokamera und Mikroskopaufsatz, auf einem Fahrtisch installiert wird und daß dieser Fahrtisch die sechs Zellkulturkammern 20 der Zellkulturkammergruppierung A in frei wählbaren Intervallen abfährt. Die Justierung des Beobachtungssystems erfolgt für die einzelne Zellkultur bei Versuchsstart, d.h., vorzugsweise dann, nachdem sich aussagekräftige Bereiche in der jeweiligen Zellkultur abzeichnen, durch die entsprechende, im Überwachungs- und Steue-

rungssystem G enthaltene Software, d.h., durch das entsprechende Computerprogramm sind die sechs Anfahrpositionen des Fahrtisches, auf dem das Beobachtungssystem montiert ist, programmiert. Wegen der mechanischen Toleranzen des Fahrtisches muß jedoch ein größerer als der zu beobachtende Bereich innerhalb der einzelnen Zellkulturkammer 20 aufgenommen werden. Innerhalb dieses größeren Bereichs wird nun mittels der Software der zu beobachtende Bereich definiert. Die Software ist in der Lage, Konturen zu speichern und wieder zu erkennen, d.h., beim erneuten Anfahren einer Zellkulturkammer werden die Kontur und die Anordnung der Zellen erkannt und ein anfänglich definierter Beobachtungsbereich gespeichert.

Dieses zuletzt erläuterte Beobachtungssystem ist in den Zeichnungen im einzelnen nicht dargestellt, jedoch erfolgt die Ausleuchtung der einzelnen Zellkulturkammer 20 ebenfalls mit Hilfe der Lichtquellen 24, wie bereits weiter oben im einzelnen erläutert.

Das in Figur 1 dargestellte Zellkultursystem 30 weist ferner noch ein Dosiersystem C für Flüssigkeiten (z.B. flüssige Nährmedien und dergleichen) auf, welches z.B. vier Flüssigkeitsvorratsbehälter 31 mit einer jeweils zugeordneten Flüssigkeitsentnahmeleitung 31' aufweist, wobei sodann aus diesen Flüssigkeitsentnahmeleitungen 31' ein Leitungsbündel 32 gebildet ist. Dieses Leitungsbündel 32 ist andererseits mit einem Pumpensystem 29 verbunden, durch welches die verschiedenen Zellkulturkammern 20 der Zellkulturkammergruppierung A mit frei wählbaren Flüssigkeiten, die in den Flüssigkeitsvorratsbehältern 31 enthalten sind, versorgt werden.

Das Pumpensystem 29 ist seinerseits über eine Leitung 33 an ein Multiventilmodul 30' angeschlossen. Die Zuführung der Flüssigkeiten zu der Zellkulturkammergruppierung A erfolgt von dem Multiventilmodul 30' aus über sterile Schlauchleitungssysteme

27 und 28, wobei diese Flüssigkeiten von den einzelnen Zellkulturkammern 20 flexibel weitergeleitet werden, d.h., von einer Zellkulturkammer zur nächsten. Sowohl die Flüssigkeitszuführung als auch die Flüssigkeitsweiterleitung erfolgt über sterile Schlauchsysteme, die mit Standard-Schlauchverbindererelementen und Verteilern bei Versuchsstart installiert werden, d.h., mit entsprechenden Versorgungskanälen einer jeweiligen Zellkulturkammer 20 verbunden werden. Hierbei wird die Verbindung der Standard-Schlauchelemente (in den Zeichnungen im einzelnen nicht dargestellt) mit den zugeordneten Versorgungskanälen der jeweiligen Zellkulturkammer so aufeinander abgestimmt, daß die Sterilität gewährleistet ist.

Aus Gründen der Flexibilität können die Art der Flüssigkeiten und/oder die Strömungsrichtungen und/oder die Verteilung der Flüssigkeiten und/oder deren Durchflußmengen während des Versuchs geändert bzw. gesteuert werden, wobei eine derartige Steuerung vorzugsweise durch das computergesteuerte Überwachungs- und Steuerungssystem G erfolgt. Zu diesem Zweck sind das Pumpensystem 29 mittels einer Verbindungsleitung 38 und das Multiventilmodul 30' über eine Verbindungsleitung 40 an das Überwachungs- und Steuerungssystem G angeschlossen.

Das Dosiersystem C des Zellkultursystems 30 erlaubt es somit, der Zellkulturkammergruppierung A unterschiedlichste Flüssigkeiten zuzuführen.

Das Zellkultursystem 30 weist darüberhinaus ein Begasungssystem D für unterschiedlichste Gase auf. Dieses Begasungssystem D dient dazu, die verschiedenen Zellkulturkammern 20 der Zellkulturkammergruppierung A mit unterschiedlichen Gasen, z.B. Luft, O<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub> zu begasen. Von dem Begasungssystem D aus erfolgt die Gaszuführung zu der Zellkulturkammergruppierung A mittels einer sterilen Schlauchleitung 26. Auch hierbei können die Gase von den verschiedenen Zellkulturkammern 20 unter Verwendung



entsprechend zugeordneter Versorgungskanäle flexibel weitergeleitet werden, d.h. von einer Zellkulturkammer zur nächsten.

Gaszuführung und Gasweiterleitung erfolgen insgesamt über sterile Schläuche, die mittels Standard-Schlauchverbinder-elementen und Verteilern bei Versuchsstart installiert werden. Die Verbindungen der Schlauchverbinder-elemente mit den entsprechend zugeordneten Versorgungskanälen einer jeweiligen Zellkulturkammer 20 sind so aufeinander abgestimmt, daß die Sterilität gewährleistet ist. Auch bei dem Begasungssystem D können aus Flexibilität-gründen die Art der Gase und/oder die Strömungsrichtungen und/oder die Gasverteilung und/oder die Begasungskonzentration während des Versuchs geändert bzw. gesteuert werden. Zu diesem Zweck ist wiederum das Begasungssystem D über eine Verbindungsleitung 39 an das computergesteuerte Überwachungs- und Steuerungssystem G angeschlossen, das die entsprechende Software für die Steuerung des Begasungssystems D enthält.

Schließlich gehört zu dem Zellkultursystem 30 noch ein Monitoring-System F, das vorgegebene Sensormodule 34 aufweist. Mit Hilfe dieses Monitoring-Systems F können während der gesamten Versuchsdauer die relevanten Parameter in der jeweiligen Zellkulturkammer 20 der Zellkulturkammergruppierung A mittels entsprechend zugeordneter Sensoren gemessen, insbesondere permanent gemessen werden, wobei es sich bei diesen Parametern z.B. um pH-Wert, Glucose, Lactat, Sauerstoff, Elektropotential usw. handelt. Zu diesem Zweck steht das Monitoring-System F über eine Leitung 41, über einen Knotenpunkt 42 und von dort aus über weitere Leitungen 43 und 44 und entsprechend zugeordnete Abzweigleitungen mit den einzelnen Zellkulturkammern 20 der Zellkulturkammergruppierung A des Zellkultursystems 30 in Verbindung.

Die von den (nicht gezeigten) Sensoren gemessenen Parameter werden von dem Monitoring-System F über eine Leitung 35 an das

computergesteuerte Überwachungs- und Steuerungssystem G zur entsprechenden Weiterverarbeitung weitergeleitet.

Jede Zellkulturkammer 20 weist entsprechende Sensorikanschlußkanäle auf, wie dies weiter unten noch im einzelnen erläutert wird, wobei die Sensoren und die jeweils zugeordneten Kanäle so aufeinander abgestimmt sind, daß die Sterilität gewährleistet ist.

Mit besonderem Vorzug ist das Monitoring-System F in Verbindung mit dem computergesteuerten Überwachungs- und Steuerungssystem G in der Weise ausgelegt, daß das permanente Messen der relevanten Zellkulturparameter mit Hilfe eines software-unterstützten Meßverfahrens erfolgen kann (wie bereits weiter oben erläutert).

Aus Figur 2 ist die Zellkulturkammergruppierung A des Zellsystems gemäß Figur 1 in schematischer Draufsicht zu erkennen. Bei dieser Zellkulturkammergruppierung A sind insgesamt sechs Zellkulturkammern 20 gleichsam in Reihe geschaltet, derart, daß sowohl die flüssigen Medien als auch die Gase von einer Zellkulturkammer 20 zur anderen, d.h., zur jeweils nachfolgend angeordneten Zellkulturkammer 20 kontinuierlich weitergeleitet werden können.

In jeder der sechs Zellkulturkammern 20 wird mindestens eine zu untersuchende Zellkultur angesiedelt, wobei jedoch im vorliegenden Ausführungsbeispiel der Einfachheit halber von sechs Zellkulturen gesprochen wird, deren jeweiligen Zellen mit definierten flüssigen Nährmedien, Wachstumsfaktoren, Gasen und dergleichen mehr zu versorgen sind.

Zu diesem Zweck wird einerseits ein Fluß frei wählbarer, definierter, flüssiger Medien und andererseits ein Strom unterschiedlicher Gase mit frei wählbaren Konzentrationen in die

sechs Zellkulturkammern 20 der Zellkulturkammergruppierung A in Gang gesetzt, wobei, wie bereits weiter oben erläutert, die Zuführung der Flüssigkeiten zu der Zellkulturkammergruppierung A primär von dem Multiventilmodul 30' gemäß Figur 1 aus über die sterilen Schlauchleitungssysteme 27 und 28 erfolgt, während gleichzeitig die Gaszuführung zu der Zellkulturkammergruppierung A von dem Begasungssystem D gemäß Figur 1 aus mittels der sterilen Schlauchleitung 26 erfolgt.

Zur Erleichterung der Übersicht sind die sechs aufeinanderfolgend in Reihe geschalteten Zellkulturkammern 20 mit I, II, III, IV, V und VI gekennzeichnet.

Die Schlauchleitungssysteme 27 und 28 für Flüssigkeiten und die Schlauchleitung 26 für Gase sind unmittelbar mit der ersten Zellkulturkammer I verbunden, derart, daß die Schlauchleitung 26 unmittelbar in einen Gaskanal 50 im Inneren dieser ersten Zellkulturkammer mündet, wohingegen das Schlauchleitungssystem 27 in einen entsprechenden Flüssigkeitskanal 51 und das Schlauchleitungssystem 28 in einen Flüssigkeitskanal 52 jeweils im Inneren dieser ersten Zellkulturkammer I einmünden. Somit wird zunächst die in der ersten Zellkulturkammer I enthaltene Zellkultur mit flüssigen Medien und Gasen versorgt, woraufhin sukzessive die nachfolgenden Zellkulturkammern II bis VI in entsprechender Weise mit flüssigen Medien und Gasen versorgt werden. Im einzelnen ist die Zellkulturkammer I über Flüssigkeits-Schlauchleitungen 27A und 28A und über eine Gas-Schlauchleitung 26A mit der zweiten Zellkulturkammer II verbunden, diese wiederum über Flüssigkeits-Schlauchleitungen 27B und 28B und eine Gas-Schlauchleitung 26B mit der dritten Zellkulturkammer III verbunden, die ihrerseits wiederum über Flüssigkeits-Schlauchleitungen 27C und 28C und eine Gas-Schlauchleitung 26C mit der vierten Zellkulturkammer IV verbunden ist, während diese wiederum über Flüssigkeits-Schlauchleitungen 27D und 28D sowie über eine Gas-Schlauchleitung 26D mit der fünften

Zellkulturkammer V verbunden ist, und schließlich ist die letztere über Flüssigkeits-Schlauchleitungen 27E und 28E und über eine Gas-Schlauchleitung 26E mit der sechsten Zellkulturkammer VI verbunden.

Aufgrund dieser Hintereinanderschaltung der sechs Zellkulturkammern 20 mündet jede Flüssigkeits-Schlauchleitung 28A bzw. 28B bzw. 28C bzw. 28D bzw. 28E jeweils in einen Flüssigkeitskanal 52 im Inneren jeder Zellkulturkammer, jede Flüssigkeits-Schlauchleitung 27A bzw. 27B bzw. 27C bzw. 27D bzw. 27E mündet in einen entsprechenden Flüssigkeitskanal 51 im Inneren jeder Zellkulturkammer, wohingegen jede Gas-Schlauchleitung 26A bzw. 26B bzw. 26C bzw. 26D bzw. 26E in einen entsprechenden Gas-Kanal 50 jeder Zellkulturkammer einmündet.

Von der sechsten Zellkulturkammer VI aus gehen Flüssigkeits-Ausgangsleitungen 27F und 28F und eine Gas-Ausgangsleitung 26F ab.

Infolgedessen wird ermöglicht, daß sämtliche Zellkulturen in den sechs Zellkulturkammern I bis VI sowohl mit frei wählbaren, definierten, flüssigen Medien kontinuierlich versorgt werden als auch einer konstanten, kontinuierlichen Begasung durch das Begasungssystem D gemäß Figur 1 unterworfen werden, wie im einzelnen bereits weiter oben erläutert.

Es wird darauf hingewiesen, daß in Fig. 2 lediglich eine von vielen Flußrichtungsmöglichkeiten für Flüssigkeiten und Gase dargestellt ist.

Durch die oben erläuterten, flexiblen Schlauchleitungssysteme für Flüssigkeiten und Gase können auch andere Zellkulturkammer-Kombinationen als die in Fig. 2 gezeigte angesteuert werden.

Von ganz besonderer Bedeutung ist noch, daß die Zellkulturkammergruppierung A insgesamt permanent an das Monitoring-System F gemäß Figur 1 angeschlossen ist, damit während der gesamten Versuchsdauer alle relevanten Parameter in der jeweiligen Zellkulturkammer 20 mittels entsprechend zugeordneter Sensoren gemessen werden können. Jede der sechs Zellkulturkammern 20 ist daher in ihrem Inneren mit einem entsprechenden Kanal 53 für den Sensorikanschluß ausgerüstet. Im einzelnen ist hierbei die erste Zellkulturkammer I über eine Leitung 44A, die zweite Zellkulturkammer II über eine Leitung 44B und die dritte Zellkulturkammer III über eine Leitung 44C mit einer Leitung 44 verbunden, während die vierte Zellkulturkammer IV über eine Leitung 43A, die fünfte Zellkulturkammer V über eine Leitung 43B und die sechste Zellkulturkammer VI über eine Leitung 43C mit einer Leitung 43 verbunden ist. Die Leitungen 43 und 44 führen zu einem Knotenpunkt 42, der über eine Leitung 41 mit dem Monitoring-System F gemäß Figur 1 verbunden ist.

Mit Hilfe der im Inneren einer jeden Zellkulturkammer 20 angeordneten Sensoren, die hier im einzelnen nicht dargestellt sind, ist es möglich, die relevanten Parameter permanent zu messen, wobei sodann die jeweiligen Meßwerte über das Monitoring-System F an das computergesteuerte Überwachungs- und Steuerungssystem G gemäß Figur 1 zur entsprechenden Weiterverarbeitung weitergeleitet werden.

Aus Figur 2 ist noch ersichtlich, daß jede Zellkulturkammer 20 der Zellkulturkammergruppierung A an ihrer Oberseite ein rundes Fenster 20A mit Glasscheibe aufweist, durch das eine flächendeckende Ausleuchtung der in der jeweiligen Zellkulturkammer 20 enthaltenen Zellkultur ermöglicht ist, wie bereits weiter oben anhand der Figur 1 im einzelnen erläutert.

Die Zellkulturkammer als solche bietet im übrigen den Gegenstand einer deutschen Patentanmeldung der gleichen Anmelderin

mit der Bezeichnung "Zellkulturkammer für ein Zellkultursystem" (amtliches Aktenzeichen .....).

Mit Hilfe des erfindungsgemäßen Verfahrens zur Kultivierung von Zellen wird insbesondere die Möglichkeit geschaffen, hochkomplexe biologische Vorgänge in Echtzeit und nahezu unter in-vivo-Bedingungen zu simulieren.

Mit ganz besonderem Vorteil läßt sich das erfindungsgemäße Verfahren vor allem zur Erforschung von Zellfunktionen, zur Wirksamkeitsuntersuchung von Medikamenten, zur Arzneimittelentwicklung, zur Co-Kultivierung verschiedener Zelltypen und Gewebeteile, zu organtypischen Studien, zur Beobachtung von Tumorzellen in typischer Umgebung oder zu toxikologischen Studien einsetzen.

PAN-Biotech GmbH, Gewerbepark 13, D-94501 Aidenbach

### Patentansprüche

1. Verfahren zur Kultivierung von Zellen verschiedenster Art, insbesondere menschlicher oder tierischer Zellen, wobei von Zellen wenigstens einer bestimmten Art jeweils eine Kultur in einer definierten Umgebung angesetzt wird und wobei die Zellen der betreffenden Kultur mit zugeordneten, flüssigen Nährmedien, Wachstumsfaktoren, Gasen und dergleichen versorgt werden,

gekennzeichnet durch die Kombination folgender Verfahrensschritte:

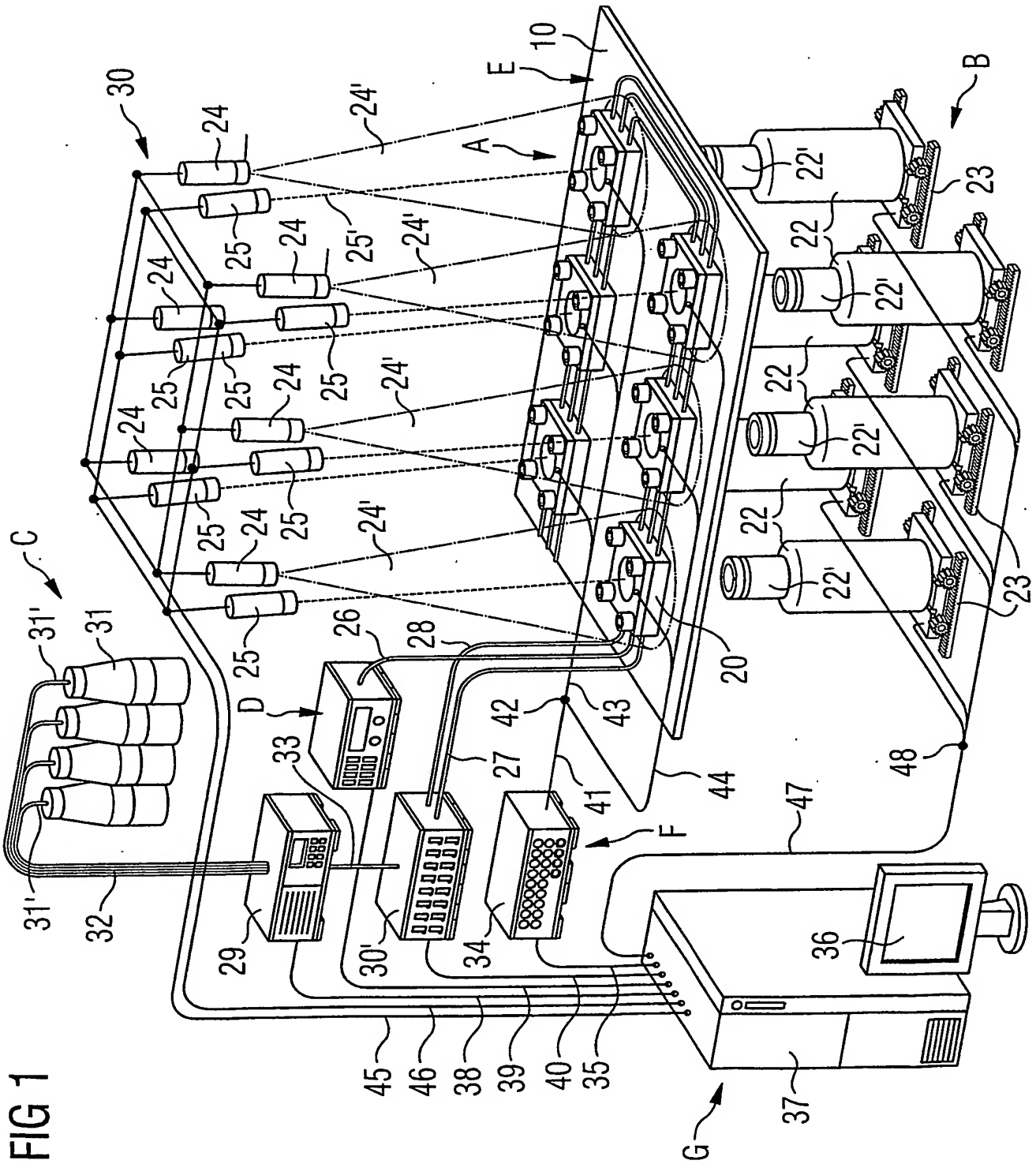
- a) Ansetzen wenigstens einer Zellkultur innerhalb wenigstens einer Zellkulturkammer (20) eines Zellkultursystems (30);
- b) Ingangsetzen eines Flusses frei wählbarer, definierter, flüssiger Medien in die wenigstens eine Zellkulturkammer (20) zur kontinuierlichen Versorgung der wenigstens einen Zellkultur;
- c) Ingangsetzen eines Stromes unterschiedlicher Gase mit frei wählbaren Konzentrationen in die wenigstens eine Zellkulturkammer (20) zur konstanten, kontinuierlichen Begasung der wenigstens einen Zellkultur;
- d) geregeltes bzw. gesteuertes Beheizen der wenigstens einen Zellkulturkammer (20) in der Art und Weise, daß hierin eine konstante Temperatur während der Dauer eines Versuches gewährleistet wird;

- e) permanentes mikroskopisches Beobachten der wenigstens einen Zellkultur innerhalb der wenigstens einen Zellkulturkammer (20), ohne während der Dauer eines Versuches Proben der Zellkultur zu entnehmen; und
  - f) permanentes Messen sämtlicher relevanten Zellkulturparameter mittels entsprechender, in die wenigstens eine Zellkulturkammer (20) integrierter Sensoren.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß eine vorgegebene Anzahl von Zellkulturen innerhalb entsprechend zugeordneter Zellkulturkammern (20) angesetzt wird, wobei diese Zellkulturkammern in Reihe geschaltet werden.
  3. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß eine vorgegebene Anzahl von Zellkulturen innerhalb entsprechend zugeordneter Zellkulturkammern (20) angesetzt wird, wobei diese Zellkulturkammern parallel geschaltet werden.
  4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß während der Dauer eines Versuchs die Art der flüssigen Medien und/oder deren Strömungsrichtungen und/oder deren Verteilung und/oder deren Durchflußmengen variiert werden.
  5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1, 2 oder 4, dadurch gekennzeichnet, daß im Falle von in Reihe geschalteten Zellkulturkammern die flüssigen Medien von Zellkulturkammer zu Zellkulturkammer kontinuierlich weitergeleitet werden.
  6. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß während der Dauer eines Versuchs die Art der Gase und/oder deren Strömungsrichtungen und/oder deren Verteilung und/oder die Begasungskonzentrationen variiert werden.

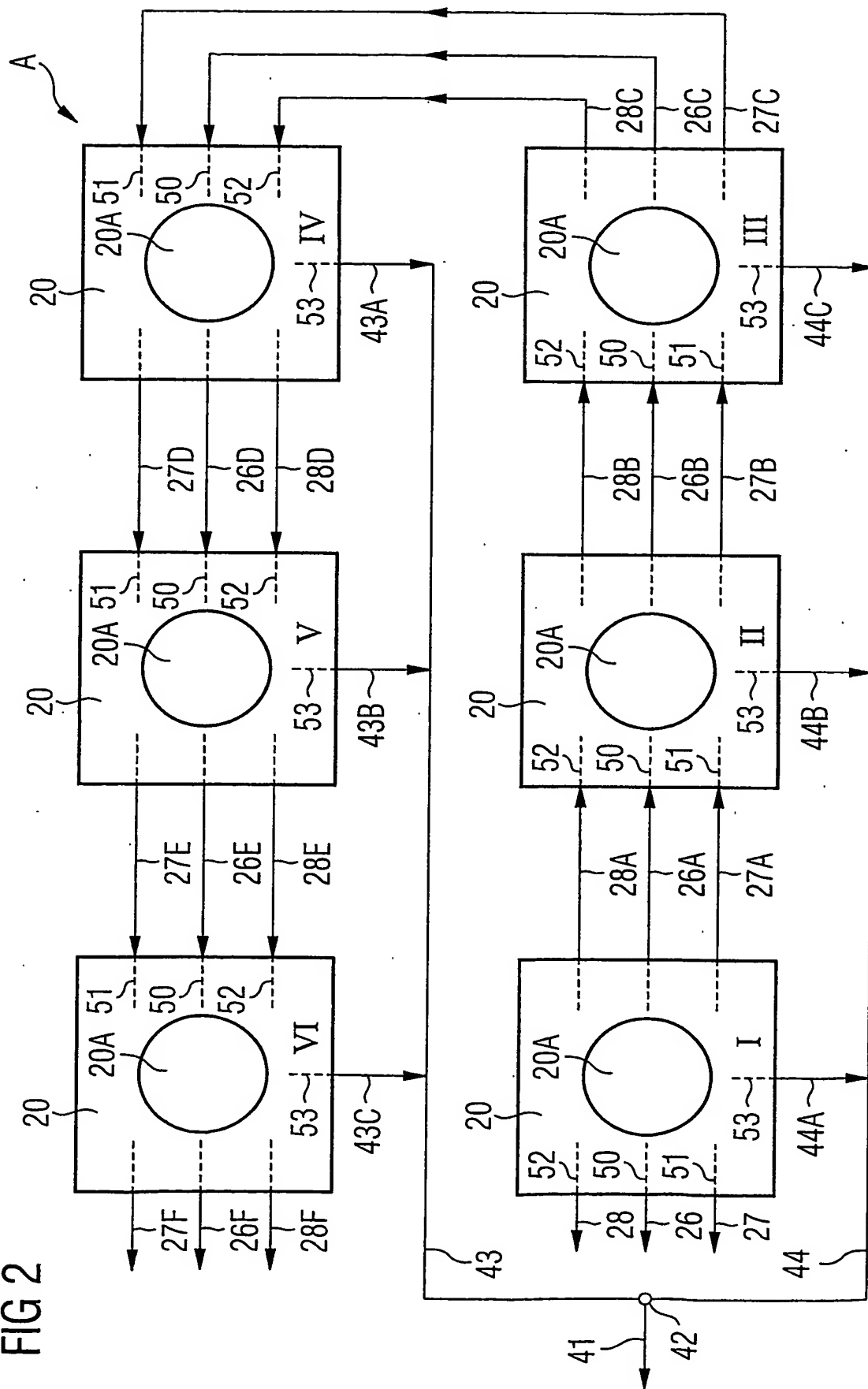


7. Verfahren nach einem der Ansprüche 2, 4, 5 oder 6, dadurch gekennzeichnet, daß im Falle von in Reihe geschalteten Zellkulturkammern (20) die Gase von Zellkulturkammer zu Zellkulturkammer kontinuierlich weitergeleitet werden.
8. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die in der wenigstens einen Zellkultur innerhalb der wenigstens einen Zellkulturkammer (20) herrschende Temperatur permanent gemessen und als Temperatur-Istwert einem entsprechenden Temperaturregel- bzw. Steuerkreis eingegeben wird, wodurch die Beheizung der Zellkulturkammer entsprechend geregelt bzw. gesteuert werden kann.
9. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß innerhalb wenigstens einer Zellkulturkammer (20) zu beiden Seiten einer gasdurchlässigen Membran je eine Zellkultur unterschiedlicher Art zum Zwecke einer direkten Co-Kultivierung beider Zellkulturen angesetzt wird.
10. Verfahren nach Anspruch 9, gekennzeichnet durch das Ingangsetzen eines ersten Medienflusses zu der einen Seite der Membran, d.h. der apikalen Seite mit der ersten Zellkultur, und eines gegenüber dem ersten Medienfluß unterschiedlichen, zweiten Medienflusses zu der anderen Seite der Membran, d.h. der basolateralen Seite mit der zweiten Zellkultur.
11. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8, gekennzeichnet durch die Anwendung des Verfahrens zur indirekten Co-Kultivierung, wobei verschiedene biologische Systeme (d.h. Gewebe-/Zellarten) in entsprechenden Zellkulturkammern (20) hintereinander geschaltet werden.

12. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, gekennzeichnet durch ein videounterstütztes mikroskopisches Beobachten der wenigstens einen Zellkultur in der wenigstens einen Zellkulturkammer (20).
13. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß sämtliche Daten, die gewonnen werden durch
- permanentes mikroskopisches Beobachten der wenigstens einen Zellkultur innerhalb der wenigstens einen Zellkulturkammer (20) und/oder
  - permanentes Messen der relevanten Zellkulturparameter und/oder
  - permanentes Messen der in der wenigstens einen Zellkultur innerhalb der wenigstens einen Zellkulturkammer (20) herrschenden Temperatur,
- zu einem computergesteuerten Überwachungs- und Steuerungssystem (G) zur dortigen Weiterverarbeitung übertragen werden.
14. Verfahren nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, daß das permanente Messen der relevanten Zellkulturparameter mit Hilfe eines software-unterstützten Meßverfahrens erfolgt.



**FIG 2**



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/EP 02/10357

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**  
IPC 7 C12M3/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

**B. FIELDS SEARCHED**

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
IPC 7 C12M

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the International search (name of data base and, where practical, search terms used)  
EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, MEDLINE

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 5 424 209 A (KEARNEY GEORGE P) 13 June 1995 (1995-06-13) Abstract, column 2, 5, 6, 18, 20 the whole document ----	1-13
X	GB 2 341 611 A (ADDAVITA LTD) 22 March 2000 (2000-03-22) page 3 -page 8 ----	1
X	EP 0 224 800 A (BOEHRINGER MANNHEIM GMBH) 10 June 1987 (1987-06-10) page 6 -page 7 ----	1
X	US 5 629 202 A (SU CHEIN-SHYONG ET AL) 13 May 1997 (1997-05-13) figure 3 ----- -/-	1

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

\* Special categories of cited documents :

- \*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \*E\* earlier document but published on or after the international filing date
- \*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- \*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- \*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- \*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- \* & \* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

29 November 2002

Date of mailing of the international search report

02/01/2003

Name and mailing address of the ISA  
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Friedrich, C

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/EP 02/10357

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CAMISARD V ET AL: "Inline characterization of cell concentration and cell volume in agitated bioreactors using in situ microscopy: Application to volume variation induced by osmotic stress." BIOTECHNOLOGY AND BIOENGINEERING, vol. 78, no. 1, 5 April 2002 (2002-04-05), pages 73-80, XP002222991 ISSN: 0006-3592 figure 1	2-13
A	US 2001/039045 A1 (CHAN PAUL ET AL) 8 November 2001 (2001-11-08) figure 1	2-13
A	US 5 665 599 A (MINUTH WILL) 9 September 1997 (1997-09-09) figure 2	2-13

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 02/10357

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5424209	A	13-06-1995	NONE	
GB 2341611	A	22-03-2000	AU 5430499 A CA 2341876 A1 CN 1323343 T EP 1121415 A1 WO 0012673 A1 JP 2002523082 T	21-03-2000 09-03-2000 21-11-2001 08-08-2001 09-03-2000 30-07-2002
EP 0224800	A	10-06-1987	DE 3541738 A1 AT 85357 T DE 3687699 D1 EP 0224800 A2 ES 2038965 T3 JP 2006530 C JP 7040928 B JP 62130683 A US 5286646 A	27-05-1987 15-02-1993 18-03-1993 10-06-1987 16-08-1993 11-01-1996 10-05-1995 12-06-1987 15-02-1994
US 5629202	A	13-05-1997	NONE	
US 2001039045	A1	08-11-2001	AU 4955901 A WO 0172954 A2	08-10-2001 04-10-2001
US 5665599	A	09-09-1997	DE 4443902 C1 JP 2847669 B2 JP 8336382 A	18-04-1996 20-01-1999 24-12-1996

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internat. Aktenzeichen

PCT/EP 02/10357

## A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7 C12M3/00

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 C12M

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der Internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, MEDLINE

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	US 5 424 209 A (KEARNEY GEORGE P) 13. Juni 1995 (1995-06-13) Abstract, column 2, 5, 6, 18, 20 das ganze Dokument	1-13
X	GB 2 341 611 A (ADDAVITA LTD) 22. März 2000 (2000-03-22) Seite 3 -Seite 8	1
X	EP 0 224 800 A (BOEHRINGER MANNHEIM GMBH) 10. Juni 1987 (1987-06-10) Seite 6 -Seite 7	1
X	US 5 629 202 A (SU CHEIN-SHYONG ET AL) 13. Mai 1997 (1997-05-13) Abbildung 3	1
	--- -/--	



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

\* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

\*A\* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

\*E\* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

\*L\* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

\*O\* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

\*P\* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

\*T\* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

\*X\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

\*Y\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

\*G\* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der Internationalen Recherche

29. November 2002

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

02/01/2003

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Beauftragter

Friedrich, C



## C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	CAMISARD V ET AL: "Inline characterization of cell concentration and cell volume in agitated bioreactors using in situ microscopy: Application to volume variation induced by osmotic stress." BIOTECHNOLOGY AND BIOENGINEERING, Bd. 78, Nr. 1, 5. April 2002 (2002-04-05), Seiten 73-80, XP002222991 ISSN: 0006-3592 Abbildung 1	2-13
A	US 2001/039045 A1 (CHAN PAUL ET AL) 8. November 2001 (2001-11-08) Abbildung 1	2-13
A	US 5 665 599 A (MINUTH WILL) 9. September 1997 (1997-09-09) Abbildung 2	2-13

# INTERNATIONALER RESEARCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationaler Patentzeichen

PCT/EP-02/10357

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
US 5424209	A	13-06-1995	KEINE
GB 2341611	A	22-03-2000	AU 5430499 A 21-03-2000 CA 2341876 A1 09-03-2000 CN 1323343 T 21-11-2001 EP 1121415 A1 08-08-2001 WO 0012673 A1 09-03-2000 JP 2002523082 T 30-07-2002
EP 0224800	A	10-06-1987	DE 3541738 A1 27-05-1987 AT 85357 T 15-02-1993 DE 3687699 D1 18-03-1993 EP 0224800 A2 10-06-1987 ES 2038965 T3 16-08-1993 JP 2006530 C 11-01-1996 JP 7040928 B 10-05-1995 JP 62130683 A 12-06-1987 US 5286646 A 15-02-1994
US 5629202	A	13-05-1997	KEINE
US 2001039045	A1	08-11-2001	AU 4955901 A 08-10-2001 WO 0172954 A2 04-10-2001
US 5665599	A	09-09-1997	DE 4443902 C1 18-04-1996 JP 2847669 B2 20-01-1999 JP 8336382 A 24-12-1996